文章编号:1000-5404(2005)04-0331-03

论著

活性氧在急性尿潴留大鼠膀胱功能损害中的作用研究

李文刚[1],方 强[1],杨 景[2],宋 波[1],文前军[1] (第三军医大学西南医院:[1]全军泌尿外科中心,[2]病理科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨活性氧在急性尿潴留大鼠膀胱功能损害中的作用。**方法** 健康雌性Wistar大鼠分为5组($n=5$):正常对照组(C组);其余4组为实验组,并以2倍于正常膀胱容量生理盐水过度充盈2 h,分别于排空后0 h(E0组)、排空后1 h(E1组),排空后2 h(E2组)行充盈性膀胱测压和膀胱组织ATP酶活力与丙二醛(MDA)含量测定;治疗组在膀胱排空前10 min心内注射过氧化物歧化酶(SOD)500U(SOD组,$n=5$),余处理同E2组。**结果** 膀胱过度充盈后其顺应性降低,不稳定收缩增多($P<0.01$)。ATP酶活力在排空后1 h显著降低,而MDA在排空后1 h上升至最高水平。膀胱排空前注射SOD,MDA含量较E2组显著降低,膀胱功能显著改善($P<0.01$)。**结论** 活性氧在急性尿潴留对大鼠膀胱功能损害中起着重要作用,抗氧化剂可以保护活性氧对膀胱功能的损害作用。

关键词:急性尿潴留;活性氧;膀胱功能障碍;过氧化物歧化酶;丙二醛
中图法分类号:R334.3; R694.55; R852.15 **文献标识码**:A

Roles of reactive oxygen species in acute retention bladder in rats

LI Wen-gang[1], FANG Qiang[1], YANG Jing[2], SONG Bo[1], WEN Qian-jun[1] ([1]Urinary Research Center, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of reactive oxygen species (ROS) in acute retention bladder in rats. **Methods** A total of 25 female Wistar rats were randomized into 5 groups: group 1 without overdistention (OD) (group C, $n=5$), group 2 with 2 h OD (group E0, $n=5$), group 3 with 2 h OD and 1 h recovery after emptying (group E1, $n=5$), group 4 with 2 h OD and 2 h recovery (group E2, $n=5$). Rats in group 5 with 2 h OD and 2 h recovery (group SOD, $n=5$) were injected with 500 U superoxide dismutase (SOD) through the cardiac ventricle at 10 min before emptying. Cystometrography was performed in pre-overdistention and post-emptying. Then bladders were excised and frozen in liquid nitrogen for determination of the activity of adenosine triphosphatase (ATPase) and concentration of malondialdehyde (MDA). **Results** The compliance of post-overdistention bladder decreased sharply as compared with that of the pre-overdistention and overdistention bladder, while frequency of overactivity was higher than that of the pre-overdistention and overdistention bladder. Furthermore, the activity of 3 kinds of ATPase in the bladder in group E1 reduced sharply. The concentration of MDA increased during overdistention period and early period of emptying and peaked at 1 h after emptying. After injection of superoxide dismutase, the concentration of MDA in group SOD bladder was lower than that in group E2 bladder. At the same time, the bladder function was improved. **Conclusion** ROS is a main factor contributing to injury of overdistention/ emptying bladder. Antioxidant can protect bladder function from injury of over-distention.

Key words: urinary retention; reactive oxygen species; vesical dysfunction; superoxide dismutase; malondialdehyde

急性尿潴留是下尿路梗阻常见的一种并发症,反复尿潴留常导致膀胱结构和功能的严重损害。但其具体的分子机制尚不明确,目前临床上采取单纯留置导尿管引流,被动等待其功能恢复,缺乏积极的治疗措施。已有文献[1]报道急性尿潴留/排空时膀胱血流动力学变化存在典型的缺血再灌注特点,后者不仅引起组织细胞能量代谢障碍,同时还产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),并造成组织细胞严重损害。为此,本研究以急性尿潴留大鼠为模型,探讨活性氧在急性尿潴留大鼠膀胱功能损害中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雌性Wistar大鼠(购自第三军医大学实验动物中心),4~5月龄,体质量200~245 g。根据预实验结果将25只大鼠分为5组,每组5只:正常对照组(C组)仅行充盈性膀胱测压,实

作者简介:李文刚(1966-),男,陕西省蓝田县人,硕士,主治医师,主要从事泌尿外科临床方面的研究。电话:(023)68754000-72007
通讯作者:宋 波,电话:(023)68754186,E-mail:songb-mr@vip.sian.com
收稿日期:2004-10-24;修回日期:2005-01-12

验组以2倍于正常膀胱容量生理盐水充盈膀胱2 h,分别于排空后0 h(E0组)、排空后1 h(E1组),排空后2 h(E2组)行充盈性膀胱测压;治疗组在膀胱排空前10 min心内注射SOD 500 U(SOD组),余处理同E2组。

1.2 主要试剂

ATP酶活性及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程公司)、四氮唑蓝(NBT,Sigma公司)、TUNEL试剂盒(Roche公司)、过氧化物歧化酶(SOD,Sigma公司)。

1.3 充盈性膀胱测压

大鼠麻醉后经尿道插入硬膜外导管,4号丝线环绕尿道缝扎、固定导尿管,排空膀胱。导管尾端接T形三通管,一侧端与压力传感器相连,另一端与微量灌注泵连接。以0.9%生理盐水0.1 ml/min灌注膀胱,膀胱容量定为灌注时膀胱压达15 cmH_2O对应的灌注量为膀胱容量并观察膀胱顺应性和有无不稳定收缩。

1.4 急性尿潴留大鼠模型的建立

参照Chien等[2]所建膀胱过度充盈模型进行,即膀胱测压后排空膀胱,以同样灌注速度充盈膀胱,灌注量达到测定膀胱容量的2倍,保持2 h,E0组于充盈2 h导尿管接膀胱测压管观察有无不稳定性收缩。其余各组分别于排空后(post overdistention, post-OD) 1、2 h行充盈性膀胱测压,灌注量为正常膀胱容量。

1.5 膀胱组织ATP酶及MDA测定

各组大鼠膀胱测压结束后行下腹部正中切口,游离并切除膀胱,标本用于ATP酶活性及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量测定,具体步骤参照试剂盒说明书进行。

1.6 统计学方法

实验结果以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0软件进行多变量方差分析和重复测量的方差分析。

2 结果

2.1 膀胱过度充盈前后功能改变

膀胱过度充盈前大鼠膀胱顺应性好,为(0.103 ± 0.029) ~ (0.116 ± 0.012) ml/cmH_2O,无或偶发不稳定收缩(0 ~ 1)次/10 min。过度充盈后膀胱顺应性显著降低($P < 0.01$),2 h最低(0.019 ± 0.005) ml/cmH_2O;不稳定收缩次数显著增多($P < 0.01$),在排空后2 h为(8.1 ± 1.7)次/10 min。而SOD组膀胱顺应性好,不稳定收缩频率较E2组减少($P < 0.05$),见表1。

表1 膀胱过度充盈前后膀胱功能变化

Tab 1 Changes of bladder function before and after overdistention

Group	Compliance(ml/cmH_2O)		DI (times/10 min)	
	Pre-OD	Post-OD	Pre-OD	Post-OD
C	0.103 ± 0.029	—	0.4 ± 0.4	—
E0	0.108 ± 0.022	—	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.5
E1	0.108 ± 0.022	0.019 ± 0.006*	0.5 ± 0.3	6.2 ± 2.0*
E2	0.116 ± 0.012	0.019 ± 0.005*	0.3 ± 0.3	6.8 ± 1.6*
SOD	0.112 ± 0.021	0.057 ± 0.012*#	0.4 ± 0.1	2.7 ± 0.81*#
F		46.382		21.250
P		< 0.05		< 0.05

*: $P < 0.01$, *vs* pre-OD; #: $P < 0.01$, *vs* E2

2.2 各组膀胱组织ATP酶活性变化

对照组Na-K-ATP酶、Ca-ATP酶、Mg-ATP酶活性在(0.078 ± 0.009) ~ (0.090 ± 0.009) $\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$之间,在膀胱过度充盈2 h期间,3种ATP酶活性无显著变化,排空后1 h ATP酶活性显著降低($P < 0.01$),2 h恢复至正常水平;而SOD组ATP酶活性与排空后2 h ATP酶活性无差异($P > 0.05$),见表2。

表2 膀胱充盈前后3种ATP酶活性变化($\bar{x} \pm s$, $\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$)

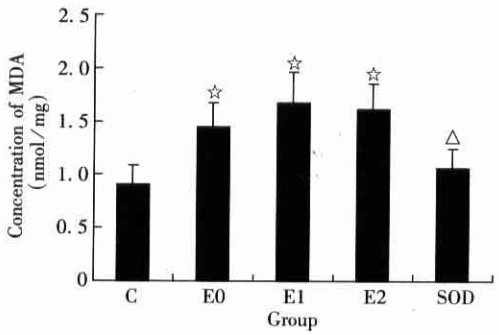
Tab 2 Changes of activity of ATPases in rat bladder before and after overdistention ($\bar{x} \pm s$, $\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$)

Group	Na-K ATPase	Ca-ATPase	Mg-ATPase
C	0.078 ± 0.009	0.076 ± 0.012	0.090 ± 0.009
E0	0.085 ± 0.010	0.078 ± 0.012	0.100 ± 0.017
E1	0.008 ± 0.001*	0.010 ± 0.001*	0.010 ± 0.002*
E2	0.079 ± 0.006	0.078 ± 0.007	0.101 ± 0.016
SOD	0.078 ± 0.006	0.075 ± 0.006	0.088 ± 0.009

$F = 59.884$(Hotelling's Trace test), $P < 0.01$; *: $P < 0.01$, *vs* C

2.3 各组膀胱组织MDA含量改变

正常膀胱组织MDA含量为(0.91 ± 0.18) nmol/mg,在膀胱过度充盈期间,组织中MDA含量增高,排空后1 h达高峰(1.68 ± 0.28) nmol/mg,至排空后2 h仍保持较高水平,与对照组有显著性差异($P < 0.01$);而SOD组MDA含量为(1.06 ± 0.18) nmol/mg,比排空后2 h显著降低($P < 0.01$),见图1。



☆: $F = 11.956$, $P < 0.001$, *vs* group C; △: $P < 0.01$, *vs* E2

图1 膀胱组织MDA含量变化

Fig 1 Changes of the concentration of MDA in rat bladder

3 讨论

急性尿潴留是下尿路梗阻常见的一种并发症,常可导致膀胱结构和功能的损害。目前,对急性尿潴留引起的膀胱功能损害的研究尚处于初步阶段。

多数研究急性尿潴留对膀胱功能的影响以逼尿肌收缩力为指标[1,3],但是膀胱功能除收缩力外还有顺应性、兴奋性,后二者变化尚少见文献报道。本研究成功建立短期大鼠急性尿潴留模型,结果显示膀胱过度充

盈期其不稳定性收缩与充盈前无显著差异，但是排空后其顺应性显著下降、不稳定收缩频率明显增高。Bratslavsky 等[4]以膀胱单纯缺血/再灌注模型观察到在缺血 4 h 逼尿肌收缩力与对照组比无差异，而再灌注期逼尿肌收缩力显著下降。提示膀胱排空后再灌注是导致逼尿肌损害的主要原因。为了进一步证实此结论，我们测定膀胱组织中 3 种 ATP 酶，该酶活性可较早反应组织损害情况，再者正常膀胱组织主要由逼尿肌层构成，ATP 酶活性变化可较好反映逼尿肌损害情况。结果显示膀胱组织 ATP 酶活性在膀胱排空后1 h 显著下降，进一步证实了我们的推断。

急性尿潴留时膀胱内压力增高，引起血管阻力增加，使膀胱缺血缺氧；排空后膀胱压下降，血流恢复，膀胱血流出现再灌注变化[5]。急性尿潴留排空后后膀胱组织中反映活性氧损害的脂质过氧化产物 MDA 含量升高，逼尿肌收缩力下降，膀胱排空前给予抗氧化剂甘露醇可保护膀胱功能，提示尿潴留引流后 ROS 参与了逼尿肌损害[6]。本研究通过测定 MDA，显示膀胱充盈期膀胱组织 MDA 含量增高，即有 ROS 增加；膀胱排空后 MDA 含量显著增高。膀胱排空前注射 SOD 可减少组织中 MDA 含量，膀胱顺应性改善、不稳定收缩频率减低。进一步说明膀胱功能损害与活性氧增多有关。以 H_2O_2 作用于逼尿肌，导致逼尿肌收缩力下降并与 H_2O_2 呈剂量依赖关系[7]。Yu 等[3]证实过度充盈期已有大量活性氧形成，膀胱排空后 1 ~ 2 min 迅速达高峰，缺血期越长，再灌注时活性氧产生量越多，并与大量中性粒细胞渗出有关。尽管缺血期有 ROS 产生，但产生量少，组织细胞抗氧化系统可清除大部分 ROS，不致引起结构改变和功能障碍；缺血期组织细胞能量代谢障碍和形成的 ROS 使组织细胞抗氧化能力降低，所以表现出再灌注期大量 ROS 作用引起膀胱功能的显著改变。

ROS 可能通过以下途径导致膀胱功能损害：①活性氧可引起脂质过氧化，使膜通透性增高，线粒体功能障碍、膜内外 Ca^{2+} 交换异常[8,9]，从而影响膀胱兴奋性和收缩力改变。②活性氧及脂质过氧化产物 MDA 还可直接引起酶、蛋白质氧化交联，使酶（如 ATP 酶）和蛋白质变性、活性丧失，细胞内 Ca^{2+} 稳态失衡，组织细胞中蛋白质结构排列紊乱，使膀胱顺应性和收缩力降低，不稳定性收缩增多。③活性氧使膀胱神经纤维变性[3]。④ROS 导致细胞内 Ca^{2+} 超载，引发细胞内依赖 Ca^{2+} 激活的磷酸脂酶、蛋白激酶活化，使细胞坏死或凋亡[10]。

本组资料显示急性尿潴留膀胱损伤主要在再灌注期，因此，对尿潴留患者的治疗应在膀胱排空前进行，给予自由基清除剂清除已产生的活性氧，缓慢排空膀胱有助于减少 ROS 的产生，可显著减轻缺血再灌注时 ROS 对膀胱的损害，保护膀胱功能。由于膀胱功能恢复常需 1 周以上[6]，所以放管时间应不少于 1 周。

参考文献：

[1] Saito M, Miyagawa I. Bladder dysfunction after acute urinary retention in rats[J]. J Urol, 2001, 165(5): 1745 - 1747.

[2] Chien C T, Yu H J, Cheng Y J, *et al*. Reduction in renal haemodynamics by exaggerated vesicovascular reflex in rats with acute urinary retention[J]. J Physiol, 2000, 526 (Pt 2): 397 - 408.

[3] Yu H J, Chien C T, Lai Y J, *et al*. Hypoxia preconditioning attenuates bladder overdistension-induced oxidative injury by up-regulation of Bcl-2 in the rat[J]. J Physiol, 2004, 554(Pt 3): 815 - 828.

[4] Bratslavsky G, Kogan B A, Matsumoto S, *et al*. Reperfusion injury of the rat bladder is worse than ischemia[J]. J Urol, 2003, 170(5): 2086 - 2090.

[5] Levin R M, Chichester P, Hass M A, *et al*. Obstructive bladder dysfunction: Morphological, biochemical and molecular changes[J]. Eur Urol Sup, 2002, 1: 14 - 20.

[6] Lin A T, Chen K K, Yang C H, *et al*. Mannitol facilitates rabbit urinary bladder recovery from overdistension injury[J]. Urology, 2000, 56(4): 702 - 707.

[7] Aikawa K, Leggett R E, Levin R M. Effect of age on hydrogen peroxide mediated contraction damage in the male rat bladder[J]. J Urol, 2003, 170 (5): 2082 - 2085.

[8] Kubota Y, Hashitani H, Fukuta H, *et al*. Role of mitochondria in the generation of spontaneous activity in detrusor smooth muscles of the Guinea pig bladder[J]. J Urol, 2003, 170(2 Pt 1): 628 - 633.

[9] Gibson G E, Zhang H, Xu H, *et al*. Oxidative stress increases internal calcium stores and reduces a key mitochondrial enzyme[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1586(2): 177 - 189.

[10] Lounsbury K M, Hu Q, Ziegelstein R C, *et al*. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 28(9): 1362 - 1369.

（编辑　张大春）